



Thérapie cellulaire de la Dystrophie musculaire de Duchenne

Yan Cherel, Karl Rouger, Thibaut Larcher, Laurence Dubreil, Jack-Yves Deschamps, Caroline Le Guiner, Grégory Jouvion, Bruno Delorme, Blandine Lieubeau-Teillet

► To cite this version:

Yan Cherel, Karl Rouger, Thibaut Larcher, Laurence Dubreil, Jack-Yves Deschamps, et al.. Thérapie cellulaire de la Dystrophie musculaire de Duchenne : Essai préclinique chez le chien myopathe. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France, Jun 2011, Paris, France. 3, 6 p., 2011. <hal-01191140>

HAL Id: hal-01191140

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01191140>

Submitted on 1 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÉRAPIE CELLULAIRE DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE : ESSAI PRÉCLINIQUE CHEZ LE CHIEN MYOPATHE

CELL THERAPY OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY: PRECLINICAL TRIAL IN GRMD DOGS

Par Yan CHÉREL^{1,2}, Karl ROUGER^{1,2}, Thibaut LARCHER^{1,2}, Laurence DUBREIL^{1,2}, Jack-Yves DESCHAMPS^{1,2},
Caroline Le GUINER^{3,4}, Gregory JOUVION^{1,5}, Bruno DELORME^{6,7,8}, Blandine LIEUBEAU^{9,2}, Marine CARLUS^{1,2}
(Communication présentée le 9 juin 2011)

RÉSUMÉ

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique progressive du muscle liée au chromosome X. Elle est la maladie génétique la plus fréquente chez l'homme. La thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de cellules souches somatiques est une voie thérapeutique riche d'intérêt. Nous avons isolé, chez un modèle de chien myopathe, une cellule souche musculaire (MuStem) qui présente les qualités indispensables à une utilisation thérapeutique : forte capacité d'amplification, capacité à fusionner avec les fibres musculaires, renouvellement du contingent de cellules satellites, dispersion dans l'organisme après administration vasculaire, persistance de l'effet à long terme, spectaculaire amélioration clinique des animaux traités. Ces résultats précliniques ouvrent la voie à un essai thérapeutique chez l'enfant atteint de dystrophie musculaire de Duchenne.

Mots-clés : muscle, cellule souche somatique, myopathie, Dystrophie musculaire de Duchenne, modèle animal, chien GRMD.

SUMMARY

Duchenne muscular dystrophy (DMD), a genetic progressive X-linked muscular dystrophy, is the most common genetic disease in humans. Cell therapy based on the use of somatic stem cells is a very promising approach. In a dog myopathy model, we isolated a muscle stem cell (MuStem) with the essential requirements for therapeutic use: high amplification capacity, ability to fuse with muscle fibers, renewal of the satellite cell population, dispersion in the whole body after vascular administration, persistence of long-term effect, and dramatic clinical improvement of treated animals. These preclinical results pave the way for a therapeutic trial in children with Duchenne muscular dystrophy.

Key words: muscle, somatic stem cell, myopathy, Duchenne muscular dystrophy, animal model, GRMD dog.

(1) INRA, UMR 703Nantes, F-44307, France,

(2) LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de l'alimentation Nantes-Atlantique, Nantes, F-44307, France,

(3) INSERM, UMR 649, Nantes, F-44035, France,

(4) CHU Hôtel Dieu, Nantes, F-44035, France,

(5) URE Histotechnologie et Pathologie, Institut Pasteur, Paris, F-75724, France,

(6) INSERM, ESPRI-EA3855, Tours, F-37032, France,

(7) Faculté de Médecine, Tours, F-37032, France,

(8) MacoPharma, Tourcoing, F-59200, France,

(9) INRA, UMR 707, Nantes, F-44307, France.

COMMUNICATION

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique progressive du muscle liée au chromosome X, due à un défaut de synthèse d'une protéine, la dystrophine (Hoffman *et al.* 1987). Elle est la maladie génétique neuromusculaire la plus fréquente, affectant une naissance de garçon sur 3500 (Emery 1991). Elle reste actuellement sans traitement curatif. La dystrophine assure un lien essentiel entre le cytosquelette des fibres musculaires et la matrice extracellulaire. Sa déficience est à l'origine d'une nécrose segmentaire répétée des fibres, générant un déficit musculaire progressif, débutant dans l'enfance et aboutissant à une incapacité locomotrice au cours de l'adolescence (Dubowitz 1975).

Pour proposer un traitement curatif d'une maladie génétique musculaire, il faut concevoir une stratégie qui résolve un certain nombre de difficultés :

- le tissu musculaire est formé de fibres géantes multinucléées dont les noyaux sont post mitotiques. Chaque fibre ou tout au moins un grand nombre d'entre elles doivent être corrigées, individuellement ;
- ce tissu représente 40 % du poids du corps et est dispersé dans tout l'organisme. Le produit thérapeutique doit atteindre l'ensemble des muscles ;
- la correction génétique doit être pérenne et éventuellement, les cellules satellites qui assurent croissance et réparation du muscle doivent être corrigées ;
- le gène muté responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne, codant la dystrophine, est le plus grand gène existant et son apport nécessite des vecteurs appropriés.

Deux types de thérapies présentent des propriétés adaptées à une maladie génétique musculaire : la thérapie génique et la thérapie cellulaire. La thérapie génique se heurte aux difficultés de transduction d'un gène de très grande taille, trop volumineux pour la plupart des vecteurs. Actuellement, les orientations de recherche portent, non pas sur le transfert du gène, mais sur la correction de ses transcrits, par exemple par saut d'exon. Le saut d'exon par morpholino fait l'objet d'un essai clinique (Cirak *et al.* 2011). Le saut d'exon vectorisé par AAV (Adeno-associated virus) est au stade des études précliniques (Servais *et al.* 2011) ; Dans ce cas, le transfert de gène doit s'accompagner d'une intégration permanente sans danger dans le génome ou être épisomal de façon stable.

Les cellules satellites représentent une population de précurseurs musculaires responsables de la croissance et de la régénération du muscle. Elles ont été considérées comme des candidates naturelles pour la thérapie cellulaire de la DMD. De nombreux travaux ont montré que le transfert de cellules satellites dans le muscle pouvait générer une production de dystrophine, mais avec une très faible efficacité et une diffusion très limitée au sein du tissu (Morgan *et al.* 1990 ; Huard *et al.* 1992 ; Karpati *et al.* 1992). Plusieurs populations de cellules souches adultes ont montré des capacités d'auto renouvellement et de différenciation dans la lignée myogénique et pourraient être des candidates

à la thérapie cellulaire de la DMD. Ce sont les cellules de la Side Population (Gussoni *et al.* 1999 ; Jackson *et al.* 1999 ; Tanaka *et al.* 2009), les CD 133 (Torrente *et al.* 2004), les mésoangio-blastes (Minasi *et al.* 2002), les cellules souches mésenchymateuses (Rodriguez *et al.* 2005 ; Pittenger *et al.* 1999 ; Goudenege *et al.* 2009), les PICs ou PW1+/Pax7- *interstitial cells* (Mitchell *et al.* 2010) et les MDSC (*Muscle derived Stem Cells*) (Qu *et al.* 1998). La plupart de ces populations ont montré des propriétés de diffusion à partir du réseau vasculaire chez la souris et la capacité à générer de la dystrophine dans les fibres musculaires. Mais, pour pouvoir prétendre à une capacité thérapeutique, elles doivent aussi pouvoir être amplifiées de façon très importante pour traiter un organisme de grande taille, tout en gardant leurs propriétés de diffusion vers le tissu musculaire.

Pour démontrer l'efficacité d'une thérapeutique, le modèle animal classiquement utilisé, la souris mdx, est insuffisant. Une lignée de chiens dystrophinopathes, les chiens GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), est heureusement disponible et est utilisée pour réaliser les essais pré-cliniques chez un animal de taille similaire à celle d'un enfant. Les animaux présentent une mutation A-G aboutissant à l'absence de production de dystrophine (Cooper *et al.* 1988 ; Sharp *et al.* 1992).

Dans l'UMR 703 INRA / Oniris, nous avons démontré que des cellules souches adultes, nommées MuStem, caractérisées par un retard d'adhérence *in vitro*, pouvaient être des candidates très intéressantes pour la thérapie de la DMD.

PRODUCTION ET AMPLIFICATION DES MUSTEM

Les MuStem sont obtenus à partir de muscle de chiens sains de deux à trois mois. Après extraction mécanique et enzymatique de l'ensemble des cellules mononucléées du muscle (fibroblastes, cellules satellites, cellules inflammatoires...), les cellules sont placées dans des flasques en milieu de croissance, puis soumises à une adaptation du protocole de pré-plating décrit par Qu en 1998 (Qu *et al.* 1998). Au bout d'une heure, les cellules non adhérentes sont collectées, puis placées dans une nouvelle

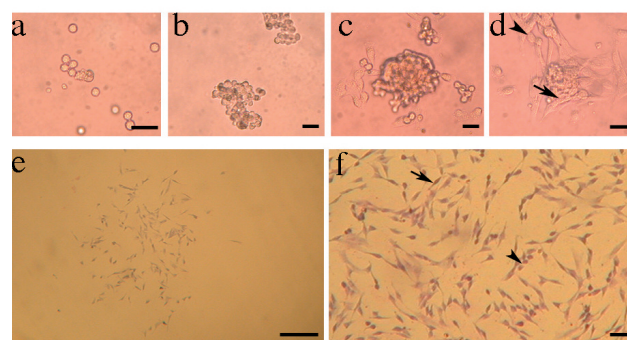
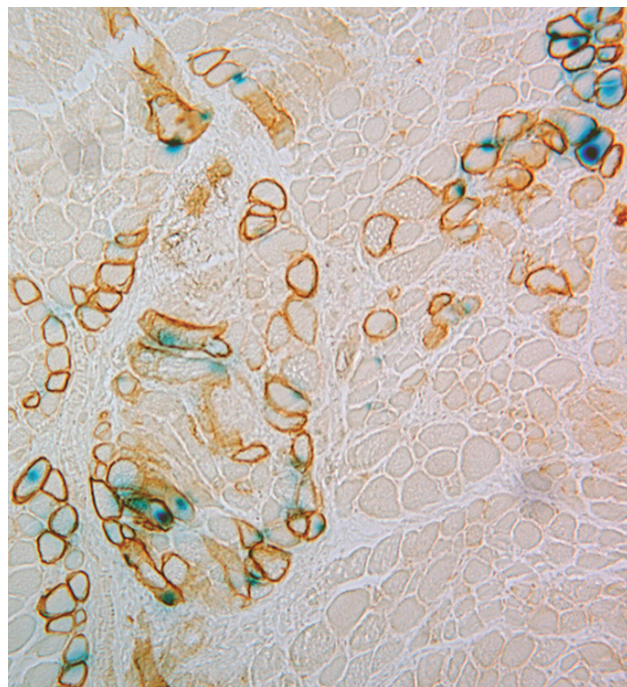


Figure 1 : Cultures de MuStem. Croissance des colonies de MuStem aux jours 7 (a), 10 (b), 12 (c) et 14 (d). Formation de microsphéroïdes (e et f) : cultures clonales montrant la double morphologie des cellules filles, sphérique et fusiforme. Barres : a, b, c, d : 25 micromètres, e et f : 100 micromètres

flasque. La même procédure est reproduite toutes les 24 heures pendant quatre jours, puis les cellules sont cultivées en milieu de croissance. La population obtenue représente $1,2 \pm 0,5$ % des cellules initialement extraites. Elle est composée de cellules présentant un retard à l'adhérence, comparées aux fibroblastes (qui ont adhéré après le premier plating) et aux myoblastes (cellules musculaires mononucléées issues des cellules satellites qui ont adhéré au cours des platings suivants). Après quelques jours de quiescence, les MuStem présentent une forte capacité proliférative réalisant 20,5 doublements de population en 36 jours, ce qui permet d'obtenir 10^5 à 10^9 cellules en moins d'un mois. Les MuStem se présentent sous la forme d'une population mixte de cellules rondes réfringentes et des cellules fusiformes, aspects morphologiques que l'on observe aussi en culture clonale (population issue d'une seule cellule) (*figure 1*). En suspension, elles forment des myosphères, composées de cellules rondes, structures ressemblant à des corps embryoides. Ces myosphères se désagrègent spontanément lorsqu'elles sont placées en milieu adhérent et génèrent des cellules fusiformes à caractéristiques musculaires. Placées en milieux d'induction appropriés, elles peuvent présenter des capacités de différenciation ostéogénique et adipogénique.

Les MuStem présentent partiellement des marqueurs de cellules satellites, le CD56 pour $81 \pm 4\%$, la bêta-intégrine pour $59 \pm 10\%$.



Près de la moitié ($46 \pm 4\%$) sont Pax7+ (marqueur spécifique des cellules myogéniques) et $42 \pm 3\%$ sont Myf5+ révélant ce facteur de régulation myogénique précoce, $49 \pm 2\%$ sont MyoD+ et $34 \pm 4\%$ desmine+. Les MuStem sont négatives pour CD45 (marqueur hématopoïétique), CD34 et CD31 (marqueurs endothéliaux) ou pour les marqueurs de lignées sanguines (CD5, CD11b, CD14, CD21). Comparées aux myoblastes, ces données démontrent que les MuStem sont des cellules déterminées, engagées dans les stades précoces de la lignée musculaire.

LES MUSTEM PARTICIPENT À LA FORMATION DES FIBRES MUSCULAIRES ET RESTAURENT L'EXPRESSION DE LA DYSTROPHINE

Après marquage des cellules *in vitro* par transduction d'un rétrovirus recombinant exprimant le gène nls-LacZ (codant une bêtagalactosidase nucléaire), les MuStem ont été injectées par voie intramusculaire chez des chiens myopathes immunosupprimés. Un mois plus tard, les biopsies musculaires révèlent la présence de fibres exprimant la dystrophine et contenant des noyaux bêtagalactosidase positifs. Plus de 70% des noyaux positifs sont localisés sous la membrane des fibres, en position normale, 15 % en position centrale au sein du cytoplasme (localisation habituellement observé dans les myotubes en régénération, et 13% sont localisés dans le tissu conjonctif (*figure 2*). Une analyse fine, par triple marquage, de la localisation des noyaux situés en périphérie des fibres révèle que 71,1% d'entre elles sont en position subsarcolemale (c'est-à-dire dans le cytoplasme, sous la membrane plasmique), 12,2% sont localisés à l'extérieur de la membrane basale et 16,7% sont localisés entre la membrane plasmique et la membrane basale, c'est-à-dire dans le niche des cellules satellites (*figure 3*). L'étude de l'expression de Pax7 au sein de cette dernière catégorie montre que les MuStem sont capables de se localiser dans la niche satellite et peuvent exprimer des marqueurs de ces cellules, c'est-à-dire acquérir une identité de cellules satellites. Par ailleurs, injectées par voie sous-cutanée à des souris SCID, les MuStem ne présentent aucun caractère tumorigène.

Figure 2 : Coupe transversale de muscle, révélation immunohistochimique de la dystrophine (lignes brunes membranaires) associée à une révélation histoenzymologique de la bêtagalactosidase (coloration bleue des noyaux). Les MuStem ont fusionné avec certaines fibres matures et généré la synthèse de dystrophine. Barre : 100 micromètres.

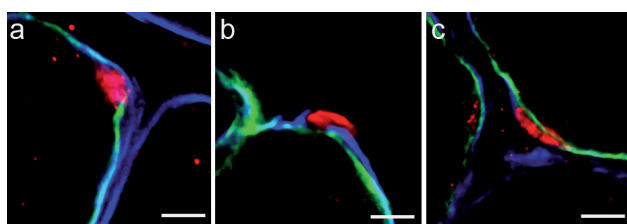


Figure 3 : Immunomarquages LacZ (en rouge), membrane plasmique (dystrophine, en vert) et membrane basale (laminine, en bleu) révélant la localisation des noyaux de MuStem, dans la fibre (a), au-delà de la membrane basale (b), et en loge satellite entre les membranes plasmique et basale (c). Barre : 25 micromètres.

LES MUSTEM EMPÊCHENT L'APPARITION DES SYMPTÔMES DE DYSTROPHIE MUSCULAIRE

Pour valider leur intérêt thérapeutique, les MuStem ont été injectées par voie intra artérielle chez des chiens GRMD immunosupprimés (cinq injections de 10^7 cellules à 15 jours d'intervalle chez des chiots de trois mois dans l'artère fémorale gauche). Les chiens GRMD témoins immunosupprimés (par Ciclosporine et Mycophénolate mofétil) présentent des symptômes d'apparition progressive classiquement observés dans le modèle. Ces symptômes sont très discrets jusqu'à l'âge de trois mois (principalement un début de palmigradie/plantigradie), puis une dégradation brutale s'observe entre trois et six mois, caractérisée par une faiblesse progressive, une raideur progressive des membres, un raccourcissement de la foulée et un transfert marqué du poids du corps vers l'avant-main. Un score clinique, adapté de celui développé par l'équipe de S. Blot à l'ENVA (Thibaud *et al.* 2007) a été utilisé : les chiens témoins conservent un score de 80 à 100% les trois premiers mois, puis cette valeur décline rapidement pour atteindre 30 à 40% vers six mois et se stabilise ensuite. Chez les chiens traités, la dégradation progressive n'est pas observée, les animaux conservent une locomotion proche de la normale et les scores cliniques restent de façon durable au-dessus de 70-80% (figure 4). Ces résultats spectaculaires sont reproductibles et durables. Les animaux survivent plus longtemps que les témoins (dont l'espérance de vie ne dépasse guère un an, du fait d'une incapacité loco-

motrice totale et / ou d'accidents de fausse déglutition). Chez les chiens traités, si les accidents de fausse déglutition n'ont pas tous disparu, la puissance musculaire, la moindre fatigabilité, la capacité à galoper sont spectaculaires. Le plus âgé des animaux a actuellement plus de trois ans, montrant la persistance des effets du traitement.

L'AMÉLIORATION CLINIQUE EST OBTENUE AVEC UNE FAIBLE EXPRESSION DE DYSTROPHINE

Pour documenter l'expression de dystrophine dans les fibres musculaires, des biopsies sont régulièrement réalisées, puis traitées par des techniques immunohistochimiques, de Western Blot et de RT-PCR. L'expression de dystrophine est observée dans un grand nombre de fibres réparties au sein du tissu (environ 20 à 30 %), dans des muscles du membre injecté, du membre controlatéral et dans des muscles de l'avant main. Cette expression est relativement faible, formant des lignes discontinues soulignant les membranes des fibres. L'expression est persistante dans le temps. L'analyse histomorphométrique de ces biopsies révèle une augmentation du nombre de fibres en régénération chez les animaux traités, ainsi qu'une diminution de l'épaisseur de la fibrose endomysiale (tissu conjonctif situé entre les fibres musculaires à l'intérieur des faisceaux).

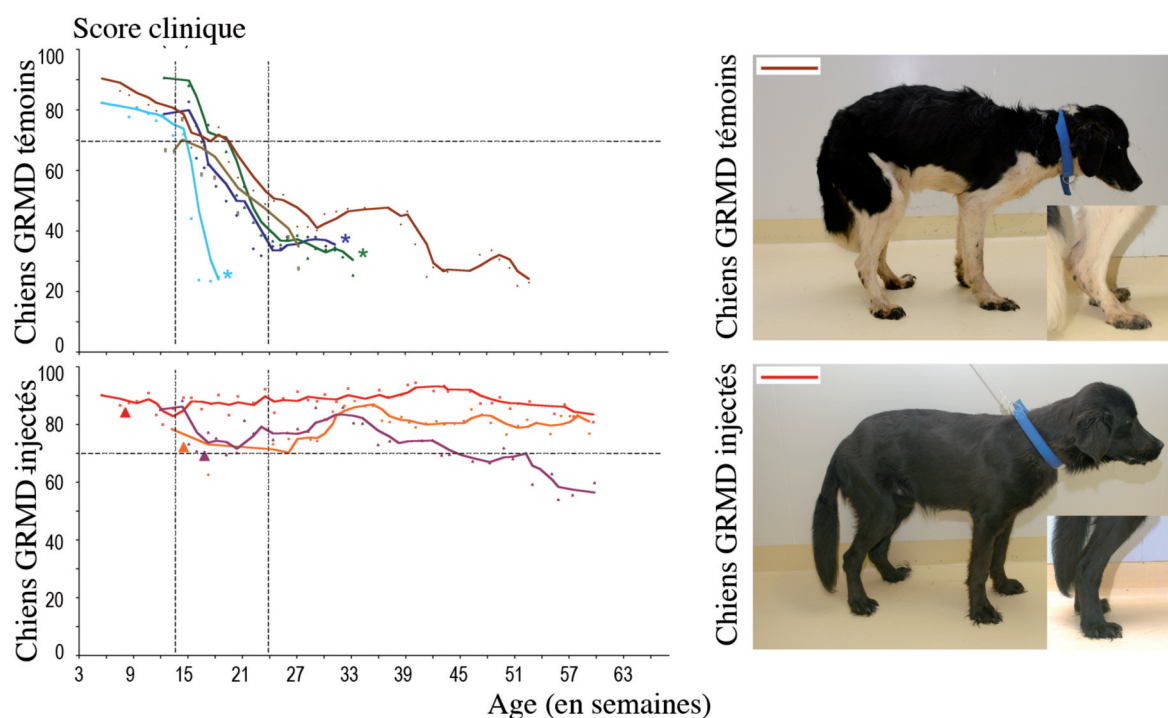


Figure 4 : Évaluation clinique des chiens GRMD témoins et traités. Le score clinique, mesuré chaque semaine est exprimé en pourcentage d'un score théorique de chien sain. Chez les chiens myopathes témoins immunosupprimés, ce score s'effondre entre trois et six mois d'âge. Chez les chiens myopathes traités, le score clinique reste élevé tout au long du suivi des animaux. Illustrations de la palmigradie/plantigradie et du transfert de poids chez le chien non traité par rapport au chien traité.

DISCUSSION

Les MuStem sont isolées selon une procédure dérivée de celle décrite par le groupe de Huard (Qu *et al.* 1998). La méthode mise au point est reproductible et permet d'isoler des cellules canines présentant des caractéristiques phénotypiques et un comportement en culture différents de ceux des MDSC qu'il a obtenus chez la souris, nous conduisant à leur donner un nom spécifique. Les MuStem isolées génèrent une population hétérogène composée de cellules fusiformes et d'une faible portion de cellules rondes, proportion qui reste constante du fait de la capacité des cellules à se diviser de façon asymétrique. La plupart des cellules présentent des marqueurs de lignée musculaire et les MuStem semblent être positionnées comme des progéniteurs myogéniques précoces. Bien qu'elles semblent engagées dans la lignée myogénique, elles sont capables *ex vivo* de différenciation multilignage. Ces propriétés différencient les MuStem des autres populations de cellules candidates au traitement des maladies génétiques du muscle.

Les capacités d'amplification des MuStem sont importantes, ce qui est une caractéristique essentielle pour la mise au point d'une stratégie thérapeutique qui s'adresse à un tissu occupant un grand volume dans l'organisme.

Injectées dans un tissu musculaire présentant des lésions sévères et évolutives, elles montrent une capacité de survie (contrairement aux myoblastes), fusionnent avec les fibres matures et codent la dystrophine, empêchant ainsi la dégradation phénotypique du tissu. Certaines d'entre elles se localisent en position satellite, caractéristique essentielle dans un contexte de disparition du contingent de cellules satellites.

L'efficacité de l'injection intravasculaire de MuStem pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne dans le modèle canin est remarquable. L'amélioration clinique est spectaculaire, les chiens traités conservant une locomotion proche de celle d'un chien sain. Cette efficacité clinique est générée par une expression faible mais dispersée de la dystrophine au sein des muscles. Jusqu'ici, un tel potentiel avait été démontré seulement pour les mésoangioblastes (Sampaoli *et al.* 2006), cellules ne présentant pas de différenciation musculaire spontanée et difficiles à amplifier. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour déterminer le nombre minimal de fibres exprimant la dystrophine et le niveau d'expression de cette dystrophine qui permettent d'interrompre le processus dystrophique. Parallèlement, les injections systémiques de MuStem n'ont jamais révélé d'effet négatif sur les autres organes, ce qui laisse augurer d'une absence de toxicité de la stra-

tégie thérapeutique proposée. L'utilisation de cellules allogéniques non mutées nous a contraints à immunosupprimer les animaux. L'immunosuppression modifie l'expression de la maladie (Radley *et al.* 2007, Miller *et al.* 1997, De Luca *et al.* 2005), mais les effets obtenus sont marqués et tous statistiquement différents des animaux contrôles immunosupprimés.

Des investigations ultérieures seront nécessaires pour évaluer les niveaux et durées d'immunosuppression nécessaires à l'implantation et à la persistance des MuStem dans le muscle, car la situation de chimère est originale par rapport à celles d'une greffe classique de cellules ou d'une greffe d'organe. Les données actuellement recueillies montrent que le moment du traitement est extrêmement critique : l'administration des cellules doit intervenir avant la mise en place d'une sclérose trop mutilante dont la capacité de réversibilité n'est pas prouvée.

L'injection par voie artérielle a révélé la capacité des MuStem à passer la barrière endothéliale et à spontanément se localiser dans le muscle dystrophique. Le protocole d'injection est actuellement en cours de simplification, se basant sur trois injections réalisées dans des vaisseaux postérieurs et antérieurs afin d'optimiser la répartition des cellules dans l'organisme.

L'action des MuStem au sein du tissu semble relever de plusieurs mécanismes : la fusion avec les fibres matures et l'expression de la dystrophine empêchent la dégradation phénotypique du tissu. La localisation en position satellite ouvre la voie à des possibilités de régénération plus tardive, en fonction des besoins du tissu. Très probablement leur action pourrait aussi être indirecte car le nombre de cellules injectées est faible par rapport à l'importance du volume du tissu à traiter. Des mécanismes d'action paracrine peuvent être suspectés étant donné la remarquable efficacité observée.

De nombreuses étapes restent à franchir avant que ces travaux se concrétisent par un traitement chez l'enfant. Les MuStem doivent être obtenues à partir de muscle humain, ce qui est en cours dans le laboratoire. Leur stabilité caryotypique durant l'expansion doit être prouvée. L'analyse des modalités d'une immunosuppression plus légère doit être réalisée. L'autorisation de réaliser un essai chez des individus jeunes doit être obtenue des organismes réglementaires. Toutefois, les données scientifiques déjà générées semblent indiquer que la voie vers un essai thérapeutique à courte échéance est ouverte, concernant la maladie génétique neuromusculaire la plus répandue chez l'homme.

REMERCIEMENTS :

Cette étude a été rendue possible grâce aux financements de l'AFM (Association française contre les Myopathies)

BIBLIOGRAPHIE

- Cirak S., Arechavala-Gomez V., Guglieri M., Feng L., Torelli S., Anthony K., Abbs S., Garralda M-E., Bourke J., Wells D.J., Dickson G., Wood M. J.A., Wilton S.D., Straub V., Kole R., Shrewsbury S.B., Sewry C., Morgan J.E., Bushby K. and Muntoni F. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. Original Research Article The Lancet, In Press, Corrected Proof, Available online 23 July 2011
- Cooper, B.J., Winand, N.J., Stedman, H., Valentine, B.A., Hoffman, E.P., Kunkel, L.M., Scott, M.O., Fischbeck, K.H., Kornegay, J.N., Avery, R.J., *et al.* 1988. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334, 154-156.
- De Luca, A., Nico, B., Liantonio, A., Didonna, M.P., Frayse, B., Pierno, S., Burdi, R., Mangieri, D., Rolland, J.F., Camerino, C., *et al.* 2005. A multidisciplinary evaluation of the effectiveness of cyclosporine a in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol.* 166, 477-489.
- Dubowitz, V. 1975. Neuromuscular disorders in childhood. Old dogmas, new concepts. *Arch Dis Child* 50, 335-346.
- Emery, A.E. 1991. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul Disord.* 1, 19-29.
- Goudenege, S., Pisani, D.F., Wdziekonski, B., Di Santo, J.P., Bagnis, C., Dani, C., Dechesne, C.A. 2009. Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol Ther.* 17:1064-1072
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., & Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.
- Hoffman, E.P. & Rowland, L.P. 1987. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54: 447-452.
- Huard, J., Bouchard, J.P., Roy, R., Malouin, F., Dansereau, G., Labrecque, C., Albert, N., Richards, C.L., Lemieux, B., and Tremblay, J.P. 1992. Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 15: 550-560.
- Jackson, K.A., Mi, T., Goodell, M.A. 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14482-14486.
- Karpati, G., Holland, P., Worton, R.G. 1992. Myoblast transfer in DMD: problems in the interpretation of efficiency. *Muscle Nerve* 15: 1209-1210.
- Miller, R.G., Sharma, K.R., Pavlath, G.K., Gussoni, E., Mynhier, M., Lancot, A.M., Greco, C.M., Steinman, L., Blau, H.M. 1997. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve* 20 : 469-478.
- Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R. *et al.* 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 129: 2773-2783.
- Mitchell, K.J., Pannerec, A., Cadot, B., Parlakian, A., Besson, V., Gomes, E.R., Marazzi, G., Sassoon, D.A. 2010. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol.* 12:257-266.
- Morgan, J.E., Hoffman, E.P., Partridge, T.A. 1990. Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *J Cell Biol.* 111: 2437-2449.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A. *et al.* 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* 157: 851-864.
- Radley, H.G., De Luca, A., Lynch, G.S., Grounds, M.D. 2007. Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 469-477.
- Rodriguez, A.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breittmayer, J.P., Groux, H. *et al.* 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse, *J Exp Med.* 201:1397-1405
- Sampaulesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., De Angelis, M.G., Campbell, K.P. *et al.* 2003. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301: 487-492.
- Servais L., Le Guiner C. Montus M. Garcia L. Fromes Y. Hogrel J.Y. Carlier P. Cherel Y. Moullier P. Forelimb loco-regional injection of rAAV8-U7SnRNA in GRMD dogs allows dose-dependent dystrophin expression and phenotype correction. In *Proceedings of the 4th International congress of Myology*, 2011 May 9-13 Lille.
- Sharp, N.J., Kornegay, J.N., Van Camp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., Roses, A.D. *et al.* (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13: 115-21
- Tanaka, K.K., Hall, J.K., Troy, A.A., Cornelison, D.D., Majka, S.M., Olwin, B.B. 2009. Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration, *Cell Stem Cell* 4:217-225.
- Thibaud, J.L., Monnet, A., Bertoldi, D., Barthelemy, I., Blot, S., Carlier, P.G. 2007. Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord.* 17 : 575-584.
- Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaulesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K. *et al.* 2004. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest.* 114: 182-195.